



IFW
Patent
Attorney Docket No. 017751-042

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In Patent Application of

Joel Richard et al.

Application No.: 10/714,347

Filing Date: November 14, 2003

Title: PLANT PROTEIN-BASED MICROCAPSULES

Group Art Unit: 1614

Examiner:

Confirmation No.: 4071

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of the following priority foreign application(s) in the following foreign country is hereby requested, and the right of priority provided in 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed.

Country: France

Patent Application No(s): 0106441

Filed: May 16, 2001

In support of this claim, enclosed is a certified copy(ies) of said foreign application(s). Said prior foreign application(s) is referred to in the oath or declaration and/or the Application Data Sheet. Acknowledgment of receipt of the certified copy(ies) is requested.

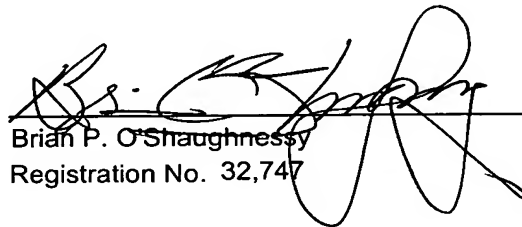
Respectfully submitted,

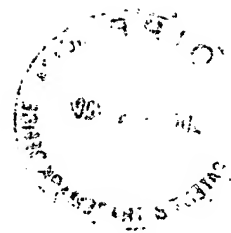
BURNS, DOANE, SWECKER & MATHIS, L.L.P.

P.O. Box 1404
Alexandria, Virginia 22313-1404
(703) 836-6620

Date: August 4, 2004

By


Brian P. O'Shaughnessy
Registration No. 32,747



THIS PAGE BLANK (USPTO)



3

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le

25 JUIN 2004

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

CERTIFIED COPY
PRIORITY DOCUMENT

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

<p>REMISE DES PIÈCES</p> <p>DATE 16 MAI 2001</p> <p>LIEU 75 INPI PARIS</p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0106441</p> <p>DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI 16 MAI 2001</p>		<p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE</p>	
<p>Vos références pour ce dossier (facultatif) 239081 CMG</p>			
<p>Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie</p>			
<p>2 NATURE DE LA DEMANDE</p> <p>Demande de brevet <input checked="" type="checkbox"/></p> <p>Demande de certificat d'utilité <input type="checkbox"/></p> <p>Demande divisionnaire <input type="checkbox"/></p> <p><i>Demande de brevet initiale</i> N° _____ Date ____/____/____</p> <p><i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i> N° _____ Date ____/____/____</p> <p>Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i> <input type="checkbox"/> N° _____ Date ____/____/____</p>		<p>Cochez l'une des 4 cases suivantes</p>	
<p>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</p> <p>MICROCAPSULES A BASE DE PROTEINES VEGETALES.</p>			
<p>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</p>		<p>Pays ou organisation _____ N° _____</p> <p>Date ____/____/____</p> <p>Pays ou organisation _____ N° _____</p> <p>Date ____/____/____</p> <p>Pays ou organisation _____ N° _____</p> <p>Date ____/____/____</p> <p><input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p>	
<p>5 DEMANDEUR</p> <p>Nom ou dénomination sociale</p> <p>Prénoms</p> <p>Forme juridique</p> <p>N° SIREN</p> <p>Code APE-NAF</p> <p>Adresse Rue</p> <p>Code postal et ville</p> <p>Pays</p> <p>Nationalité</p> <p>N° de téléphone (facultatif)</p> <p>N° de télécopie (facultatif)</p> <p>Adresse électronique (facultatif)</p>		<p><input type="checkbox"/> S'il y a d'autres demandeurs, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</p> <p>MAINELAB</p> <p>SOCIETE ANONYME</p> <p>421566142</p> <p>8, rue Andre Boquel, Parc scientifique des Capucins, 49100 ANGERS</p> <p>FRANCE</p> <p>Française</p>	



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 2/2

REMISE DES PIÈCES DATE 16 MAI 2001 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI 0106441		Réservé à l'INPI	
Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i>		239081 CMG	
6 MANDATAIRE Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville N° de téléphone <i>(facultatif)</i> N° de télécopie <i>(facultatif)</i> Adresse électronique <i>(facultatif)</i>		Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 01 44 29 35 00 01 44 29 35 99 info@regimbeau.fr	
7 INVENTEUR (S)			
Les inventeurs sont les demandeurs		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée	
8 RAPPORT DE RECHERCHE		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	
Paiement échelonné de la redevance		Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence);	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes			
10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI M. BLANCANEUX	

La présente invention a pour objet un procédé de
5 préparation de microparticules à base de protéines
végétales, et l'utilisation de ces particules dans les
domaines pharmaceutique, vétérinaire, cosmétique, agro-
alimentaire, chimique et biomédical.

La microencapsulation regroupe l'ensemble des
10 technologies permettant d'obtenir des particules
individualisées dont la taille est comprise entre 1 μ m et
1 mm, et conduisant à l'inclusion de substances ou de
principes actifs au sein d'un matériau support.

On distingue classiquement deux groupes de
15 microparticules:

- les microcapsules ou systèmes réservoirs: ce
sont des particules sphériques constituées
d'une enveloppe solide et d'un cœur de matière
active liquide, solide ou pâteuse,
- 20 - les microsphères ou systèmes matriciels : elles
sont constituées d'un réseau continu de
matériau enrobant dans lequel est dispersée la
substance à encapsuler.

Il existe trois types de procédés
25 d'encapsulation: des procédés physico-chimiques
(coacervation simple, coacervation complexe, évaporation
de solvant, extraction-évaporation de solvant, fusion à
chaud du matériau enrobant), des procédés chimiques
(polycondensation interfaciale, polymérisation en milieu
30 dispersé et gélification du matériau enrobant) et des
procédés mécaniques (encapsulation en lit d'air fluidisé,
par atomisation et par prilling).

La coacervation complexe repose sur le phénomène de désolvatation de macromolécules, l'une chargée positivement et l'autre négativement, aboutissant à la formation de deux phases non miscibles, à partir de solutions aqueuses colloïdales initialement homogènes. Ces deux phases sont :

- le coacervat, riche en polymère et appauvri en eau, qui résulte de la formation de complexes entre les macromolécules chargées positivement et celles chargées négativement,
- le surnageant pauvre en polymère et riche en eau.

L'encapsulation d'une huile par coacervation complexe consiste à émulsionner l'huile dans une solution de deux polymères. La coacervation est induite par ajustement du pH du milieu. Les complexes polymères formés s'adsorbent sur les gouttelettes d'huile et les isolent ainsi du milieu extérieur. La paroi formée est durcie par refroidissement du milieu et réticulée par l'action d'un agent de réticulation.

L'encapsulation d'une substance active offre des avantages importants tels que sa protection vis-à-vis d'agents extérieurs ou sa libération lente, retardée ou différée au site d'utilisation.

Pour des applications dans les domaines pharmaceutique, vétérinaire, cosmétique, agro-alimentaire et biomédical, les matériaux les plus recherchés comme constituants de la paroi sont des substances naturelles, en particulier les protéines ou les polysaccharides, en raison de leur biocompatibilité et de leur biodégradabilité. Parmi ces biopolymères, l'albumine, la

gélatine, le collagène et la caséine ont fait l'objet de nombreux travaux.

Ainsi, des capsules d'albumine et d'alginate de sodium ont été préparées par coacervation complexe pour
5 développer un système d'encapsulation de protéines et de polypeptides (Singh et al., J. Pharm. Pharmacol., (1989) 41, 670-673).

Une autre étude décrit l'encapsulation d'un principe actif dans des microsphères de caséine,
10 préparées par émulsion-extraction de solvant, et il a été démontré que cette protéine de lait constituait un support potentiel pour des préparations orales à libération prolongée (Latha et al., J. Control. Rel., (1995) 34, 1-7).

15 Depuis quelques années, une nouvelle approche consiste à utiliser des protéines d'origine végétale plutôt qu'animale. En effet, depuis la découverte de l'encéphalopathie spongiforme d'origine animale (maladie de la «vache folle»), les consommateurs ne font plus
20 confiance aux produits susceptibles d'être contaminés par le prion, agent potentiellement responsable de cette pathologie. Il devient donc nécessaire de trouver un substitut aux protéines animales telles que la gélatine et l'albumine. Dans la littérature, plusieurs techniques
25 d'encapsulation à partir de ces polymères d'origine végétale ont été décrites.

Un antibiotique a pu être encapsulé par coacervation simple en utilisant le gluten de blé et la caséine comme matériaux d'enrobage, dans le but d'obtenir
30 un système à libération prolongée (Jiunn-Yann Yu et al., J. of Fermentation and Bioengineering, (1997) Vol 84, 5, 444-448).

Un autre système à libération contrôlée a été développé à partir de nanoparticules de gliadine (fraction protéique du gluten de blé) obtenues par une méthode basée sur la désolvatation de macromolécules, par
5 addition d'une phase organique de protéine à une phase aqueuse (Ezpeleta et al., Int. J. Pharm., (1996) 131, 191-200).

D'autres travaux ont montré qu'il était possible de fabriquer des nano- et des microparticules à partir de
10 viciline (protéine de pois) par coacervation simple (Ezpeleta et al., J. Microencapsulation, (1997), Vol. 14, n° 5, 557-565).

Enfin, il est possible de préparer des particules possédant une paroi formée de protéines végétales par une
15 réaction de réticulation interfaciale entre ces protéines et un agent réticulant polyfonctionnel acylant. Cette méthode permet d'encapsuler des substances actives à l'état de solution, de suspension ou d'émulsion et toute protéine végétale peut être utilisée, notamment celles
20 qui sont extraites du blé, du soja, du pois, du colza, du tournesol, de l'orge ou de l'avoine (WO 99/03450).

En ce qui concerne la méthode de coacervation complexe, les couples classiquement utilisés sont la gélatine comme polycation et l'alginate de sodium, le
25 polyphosphate ou la gomme arabique comme polyanion. Des études ont montré que la gélatine pouvait être substituée par de l'albumine bovine (Singh et al., J. Pharm. Pharmacol., (1989) 41, 670-673).

Bien que la tendance soit d'utiliser des produits
30 naturels d'origine végétale comme substitut des protéines animales, aucun procédé d'encapsulation par coacervation

complexe à partir de protéines végétales n'a pu être mis en œuvre. En effet, les protéines végétales ne sont pas pures ; elles présentent de gros problèmes de solubilité du fait de la présence d'une fraction soluble et d'une
5 fraction insoluble et possèdent également un pouvoir émulsifiant faible par rapport à celui des protéines animales, ce qui rend nécessaire l'utilisation de tensioactifs supplémentaires qui interfèrent dans la phase de fixation des coacervats.

10 Or, les inventeurs, de manière surprenante, ont mis au point un procédé qui résout l'ensemble de ces problèmes.

Les inventeurs ont réussi à définir un nouveau procédé qui permet l'utilisation de ces protéines dans
15 une technique de coacervation complexe.

Aussi, la présente invention a pour objet un procédé de fabrication de microcapsules contenant un matériau à encapsuler, caractérisé en ce qu'on soumet un mélange d'au moins une protéine végétale solubilisée et
20 d'un polyélectrolyte de charge opposée à ladite protéine à une coacervation complexe en milieu aqueux suivie éventuellement d'un durcissement, en présence dudit matériau à encapsuler.

Dans un mode de réalisation préférée de
25 l'invention, le procédé comprend:

- a) la solubilisation d'au moins une protéine végétale en milieu aqueux à un pH compris entre 2 et 7 et inférieur au pH isoélectrique de ladite protéine,
- 30 b) la centrifugation de la solution obtenue en a),

- c) le mélange du surnageant obtenu en b) avec une solution aqueuse d'un polyélectrolyte de charge opposée à celle de la protéine végétale,
- 5 d) la coacervation des polyélectrolytes sous la forme de complexes de polymères, et éventuellement le durcissement des capsules, en présence du matériau à encapsuler.

L'étape b) de centrifugation est réalisée dans des conditions bien choisies, notamment à une vitesse
10 comprise entre 2 000 et 15 000 t/min préférentiellement entre 4 000 et 12 000 t/min, pendant 10 à 30 minutes.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, le procédé est caractérisé en ce que l'on augmente la quantité de protéines solubles
15 par:

- e) addition d'une quantité de protéines végétales au surnageant dans le but d'atteindre la saturation,
- f) centrifugation du mélange, et
- 20 g) éventuellement répétition des étapes e) et f) plusieurs fois.

De manière très avantageuse, le procédé de fabrication selon l'invention est caractérisé en ce que l'étape c) est mise en œuvre à un pH inférieur au pH
25 isoélectrique de la protéine végétale afin que ladite protéine soit utilisée dans l'étape d) de coacervation complexe comme polyélectrolyte cationique.

D'une autre manière avantageuse, le procédé de fabrication d'une paroi de microcapsules à base de
30 protéines végétales est caractérisé en ce que l'étape c)

est mise en œuvre à un pH supérieur au pH isoélectrique de la protéine végétale afin que ladite protéine soit utilisée dans l'étape d) de coacervation complexe comme polyélectrolyte anionique.

5 La concentration en protéines dans la solution initiale est généralement comprise entre 2 et 15%, la concentration du surnageant de la solution initiale de protéines centrifugées entre 1 et 8%, et la concentration en protéines dans la solution de coacervation entre 1,5
10 et 5%.

Les protéines végétales utilisées dans le cadre de l'invention sont extraites de végétaux choisis dans le groupe comprenant: lupin (genre *Lupinus*), soja (genre *Glycine*), pois (genre *Pisum*), pois chiche (*Cicer*),
15 luzerne (*Medicago*), féverole (*Vicia*), lentille (*Lens*), haricot (*Phaseolus*), colza (*Brassica*), tournesol (*Helianthus*) et des céréales comme le blé, le maïs, l'orge, le malt et l'avoine. A titre d'exemple, on peut citer les protéines végétales SWP100 et SWP50 et celles
20 commercialisées sous le nom Supro® 670 et PISANE®.

Avantageusement, le polyélectrolyte anionique est choisi parmi ceux classiquement utilisés par l'homme du métier, notamment ceux qui sont choisis dans le groupe comprenant l'alginate de sodium, la gomme arabique, les
25 polyphosphates, la carboxyméthylcellulose de sodium, le carraghénane, la gomme xanthane et les protéines végétales de pH supérieur au pHi. De manière avantageuse, le polyélectrolyte cationique est un de ceux classiquement utilisés par l'homme du métier notamment
30 ceux qui sont choisis dans le groupe comprenant les

agents tensioactifs cationiques, les latex possédant un ammonium quaternaire, le chitosane et les protéines végétales de pH inférieur au pHi.

5 Lorsque le procédé comprend une étape de durcissement, celle-ci peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier notamment par réticulation par un agent réticulant choisi dans le groupe comprenant les dialdéhydes tels que le glutaraldéhyde et les tanins tels que l'acide tannique.

10 Lorsque le polyélectrolyte cationique est le chitosane, le durcissement est réalisé en utilisant l'anhydride acétique comme agent durcisseur.

Dans un mode de réalisation particulièrement avantageux de l'invention, on utilise un couple
15 polycation/polyanion choisi dans le groupe comprenant les couples: SWP100/alginate, SWP100/gomme arabique, chitosane/Supro®, Supro®/alginate ou Supro®/gomme arabique.

Les microcapsules obtenues par le procédé selon
20 l'invention ont un diamètre compris entre 5 et 500 μm , de préférence 20 et 200 μm , plus préférentiellement de 20 à 50 μm .

Les microcapsules selon l'invention peuvent
25 contenir des substances aptes à être utilisées dans les domaines pharmaceutique, vétérinaire, cosmétique, agro-alimentaire, chimique et biomédical, en particulier des principes actifs. Elles peuvent être combinées avec tout ingrédient actif ou tout excipient bien connu de l'homme du métier.

Les exemples qui suivent illustrent l'invention sans toutefois la limiter.

EXEMPLE 1 : Coacervation complexe à partir de la protéine SWP100 en présence d'alginate.

Une solution de SWP100 à 10% maintenue à pH 3 est centrifugée pendant 25 minutes à 4500 t/min. On obtient 48 mL de surnageant contenant 0,72 g de protéines dissoutes. Dans cette solution de surnageant, 20 g de Miglyol® 812 sont émulsionnés. On ajoute alors 35,6 mL d'une solution aqueuse d'alginate de sodium (0,36 g) et ensuite un volume de 96 mL d'eau. La température du milieu est de 40 °C. Le pH du milieu est abaissé de 4,22 à 3 par ajout d'acide chlorhydrique 1N.

Le rapport massique SWP100/alginate est égal à 2 et la concentration finale dans la phase aqueuse en SWP100 est de 0,4% poids/volume et elle est de 0,2% poids/volume pour l'alginate.

La coacervation complexe se réalise et le milieu est refroidi à 10 °C et maintenu à 10°C pendant 1 heure. 1,5 mL de glutaraldéhyde à 25% est additionné dans le milieu à 10°C. Puis on laisse revenir le milieu à température ambiante et le milieu est maintenu sous agitation pendant 15 heures.

On obtient une dispersion de microcapsules contenant 95% d'huile, de taille moyenne comprise entre 200 et 400 µm.

Des microcapsules dont le rapport massique SWP100/alginate est égal à 1, sont préparées par la même technique.

EXEMPLE 2 : Coacervation complexe à partir de la protéine SWP100 en présence de gomme arabique.

Une solution de 100 mL de SWP100 à 17% maintenue à pH 3 est centrifugée pendant 25 minutes à 4500 t/min. On obtient 100 mL de surnageant contenant 2,6 g de protéines dissoutes. Dans cette solution de surnageant, 20 g de Miglyol® 812 sont émulsionnés. On ajoute 45 mL d'une solution aqueuse de gomme arabique (5 g) et un volume d'eau de 13 mL. La température du milieu est de 40°C. Le pH du milieu est abaissé à 3 par ajout d'acide chlorhydrique 1 N.

Le rapport massique SWP100/gomme arabique est égal à 1/2 et la concentration finale de SWP100 dans la phase aqueuse est de 1,5% poids/volume et elle est de 3% poids/volume pour la gomme arabique.

La coacervation complexe se réalise et le milieu est refroidi à 10 °C. Le milieu est laissé sous agitation pendant 1 heure et 3 mL de glutaraldéhyde à 25% sont ensuite ajoutés. Puis on laisse revenir le milieu à température ambiante toujours sous agitation pendant 6 heures.

On obtient une dispersion de microcapsules contenant 72,5% d'huile, de taille moyenne comprise entre 150 et 450 µm.

25

EXEMPLE 3 : Influence de l'augmentation de la concentration en protéine SWP100 dans le surnageant. Coacervation complexe à partir de la protéine SWP100 en présence d'alginate.

Le pH d'une solution protéique de SWP 100 à environ 15% (20 g dans 130 g d'eau) est ajusté à une valeur de 4. La solution est centrifugée une première fois à 12 000

t/min pendant 15 minutes. Le culot est retiré et une quantité de 12 g de protéines SWP100 est ajoutée dans le surnageant dont le pH est à nouveau ajusté à 4.

Une seconde centrifugation est effectuée et cette
5 opération est répétée une troisième fois.

Après la première centrifugation, le surnageant contient 2,9% de protéine soluble. Après trois centrifugations, la concentration en protéine soluble est de 3,6%.

10 Le rapport massique SWP100/gomme arabique est égal à 1 et la concentration finale de SWP100 et de gomme arabique dans la phase aqueuse est de 2% poids/volume.

La coacervation complexe est réalisée avec le surnageant concentré de SWP100 à pH 4 (100 mL contenant
15 3,6 g de protéine) et la gomme arabique comme polyélectrolyte anionique (80 mL contenant 3,6 g de gomme arabique). La coacervation est réalisée selon le mode opératoire décrit dans l'exemple 1.

On obtient une dispersion de microcapsules contenant
20 73,5 % d'huile, de taille moyenne comprise entre 50 et 400 μm .

EXEMPLE 4 : Coacervation complexe à partir du couple Supro® 670/alginat

25 Des capsules sont préparées selon le mode opératoire de l'exemple 1 à partir d'une solution de Supro® 670 composée de 22,5 g d'eau et 2,5 g de protéine et une solution d'alginat composée de 150 g d'eau et 1,84 g d'alginat.

30 Le pH de coacervation est égal à 3,8.

On obtient des microcapsules en suspension qui contiennent 82 % d'huile et qui présentent une paroi

fragile à l'aspect granuleux. La taille moyenne des microcapsules est comprise entre 50 et 400 μm .

5 **EXEMPLE 5 : Evaluation des protéines végétales comme polyélectrolyte anionique**

Une solution de protéine Supro® 670 à 10% est ajustée à pH 7, et centrifugée une première fois à 4500 t/min pendant 25 minutes. Le culot est retiré et le surnageant composé de 43 mL d'eau et 2,57 g de protéine
10 est utilisé pour la coacervation.

20 g de Miglyol® 812 sont émulsionnés dans le surnageant de la solution de protéine Supro® 670, puis une solution de chitosane 2622 composée de 120 mL d'eau et 1,5 g de chitosane à pH 1,32 est ajouté dans le milieu
15 à 40°C.

Le pH de coacervation est ajusté à 6. Le mode opératoire est ensuite identique à celui décrit pour l'exemple 1.

On obtient une dispersion de microcapsules contenant
20 83 % d'huile, de taille moyenne comprise entre 50 et 400 μm .

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication de microcapsules contenant un matériau à encapsuler, caractérisé en ce qu'on soumet un
5 mélange d'au moins une protéine végétale solubilisée et d'un polyélectrolyte de charge opposée à ladite protéine à une coacervation complexe en milieu aqueux suivie éventuellement d'un durcissement, en présence dudit matériau à encapsuler.
- 10 2. Procédé de fabrication de microcapsules à base de protéines végétales selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend
- 15 a) la solubilisation d'au moins une protéine végétale en milieu aqueux à un pH compris entre 2 et 7 et inférieur au pH isoélectrique de ladite protéine,
 - b) la centrifugation de la solution obtenue en a),
 - c) le mélange du surnageant obtenu en b) avec une
20 solution aqueuse d'un polyélectrolyte de charge opposée à celle de la protéine végétale,
 - d) la coacervation des polyélectrolytes sous la forme d'un complexe de polymères, et éventuellement le durcissement des capsules, en
25 présence du matériau à encapsuler.
3. Procédé de fabrication de microcapsules à base de protéines végétales selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on augmente la quantité de protéines solubles
30 par :
- e) addition d'une quantité de protéines végétales au surnageant obtenue à l'étape b),

- f) centrifugation du mélange et
- g) éventuellement répétition des étapes e) et f) plusieurs fois.

5 4. Procédé de fabrication de microcapsules à base de
protéines végétales selon l'une quelconque des
revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'étape c)
est mise en œuvre à un pH inférieur au point
isoélectrique de la protéine végétale afin que ladite
10 protéine soit utilisée dans l'étape d) de coacervation
complexe comme polyélectrolyte cationique.

5. Procédé de fabrication de microcapsules à base de
protéines végétales selon l'une quelconque des
15 revendications 1 à 3, caractérisé en ce que l'étape c)
est mise en œuvre à un pH supérieur au pH isoélectrique
de la protéine végétale afin que ladite protéine soit
utilisée dans l'étape d) de coacervation complexe comme
polyélectrolyte anionique.

20

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à
5, caractérisé en ce que les protéines végétales sont
extraites de végétaux choisis dans le groupe comprenant
lupin (genre *Lupinus*), soja (genre *Glycine*), pois (genre
25 *Pisum*), pois chiche (*Cicer*), luzerne (*Medicago*), féverole
(*Vicia*), lentille (*Lens*), haricot (*Phaseolus*), colza
(*Brassica*), tournesol (*Helianthus*) et des céréales comme
le blé, le maïs, l'orge, le malt et l'avoine.

30

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 et 6, caractérisé en ce que le polyélectrolyte anionique est choisi dans le groupe comprenant l'alginate de sodium, la gomme arabique, les polyphosphates, la
5 carboxyméthylcellulose de sodium, le carraghénane, la gomme xanthane et les protéines végétales de pH supérieur au pHi.

8. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 et 5 à 6, caractérisé en ce que le polyélectrolyte cationique est choisi dans le groupe comprenant des agents tensioactifs cationiques, des latex possédant un ammonium quaternaire, le chitosane et les protéines végétales de pH inférieur au pHi.

15

9. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le durcissement est réalisé par réticulation par un agent réticulant choisi dans le groupe comprenant les dialdéhydes tels que le
20 glutaraldéhyde et les tanins tels que l'acide tannique.

10. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que lorsque le polyélectrolyte cationique est le chitosane, le durcissement est réalisé en utilisant
25 l'anhydride acétique comme agent durcisseur.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que l'on utilise un couple polycation/polyanion choisi dans le groupe comprenant les
30 couples: SWP100/alginate, SWP100/gomme arabique, chitosane/Supro®, Supro®/alginate ou Supro®/gomme arabique.

12. Utilisation des capsules obtenues par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour la fabrication de compositions utiles dans les domaines pharmaceutique, vétérinaire, cosmétique, agro-
5 alimentaire, chimique et biomédical.

13. Compositions pharmaceutique, vétérinaire, cosmétique, agro-alimentaire ou chimique, caractérisées en ce qu'elles contiennent des microcapsules selon l'une
10 quelconque des revendications 1 à 11, en association avec tout excipient acceptable.

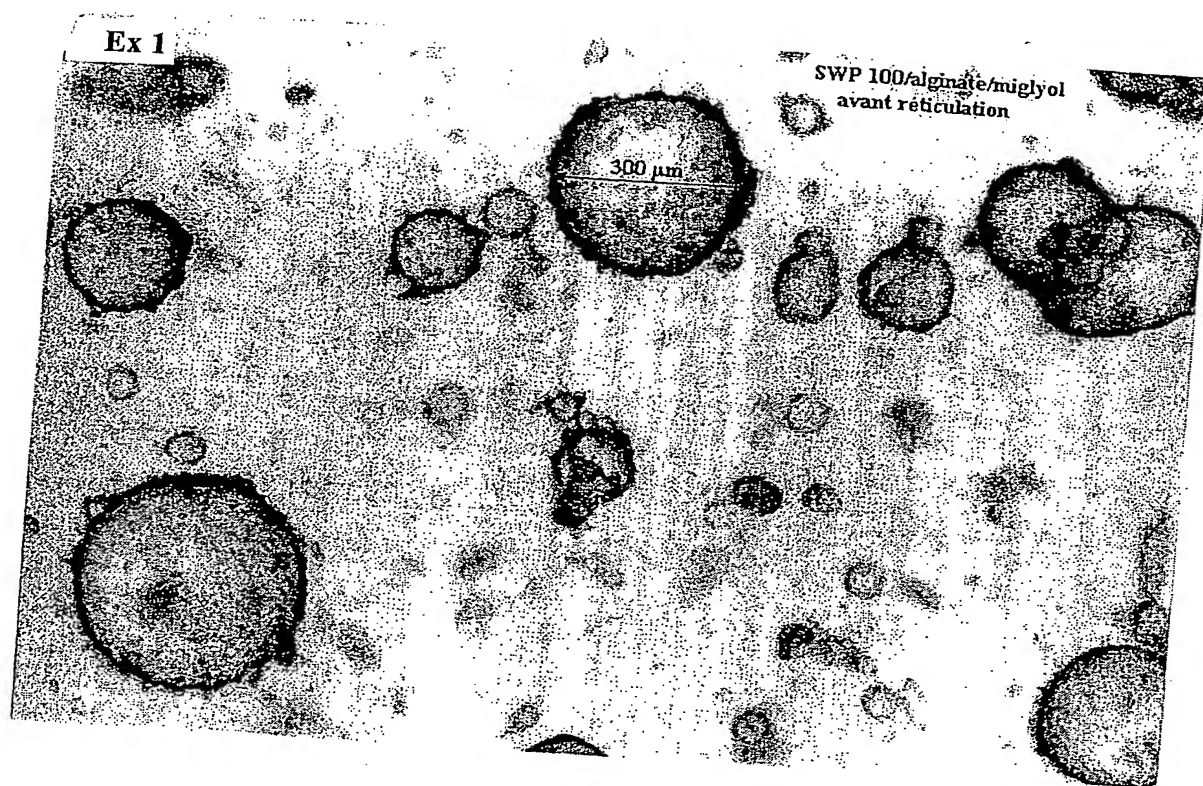


Figure 1

BEST AVAILABLE COPY

BREVET D'INVENTION
CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

DÉPARTEMENT DES BREVETS

 26 bis, rue de Saint Pétersbourg
 75800 Paris Cedex 08

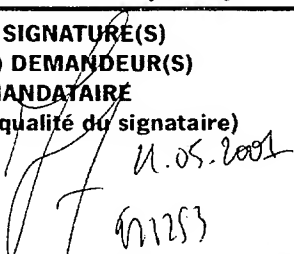
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1 / 1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

Vos références pour ce dossier			
(facultatif) 39081 CMG			
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0106441	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
MICROCAPSULES A BASE DE PROTEINES VEGETALES.			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
MAINELAB : 8, rue Andre Boquel, Parc scientifique des Capucins, 49100 ANGERS - FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		RICHARD Joël	
Prénoms			
Adresse	Rue	La Modtais 49160 BLOU	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		MORTEAU Sophie	
Prénoms			
Adresse	Rue	4, Square Y. David 49800 LA BOHALLE	
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
 11.05.2001 11253			

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of

Richard, Joel et. al.

U.S. Application Serial No. : 10/714,347

Filed : November 14, 2003

For : Plant Protein-Based Microcapsules

**I, Claire MOUGET-GONIOT, c/o CABINET REGIMBEAU, of
20 rue de Chazelles, F-75847 PARIS CEDEX 17, FRANCE, do
solemnly and sincerely declare that I am conversant with the English
and French languages and that to the best of my knowledge and belief
the following is a true and correct translation of the PCT Application
filed under No. PCT/FR02/01652.**

Dated this 26th day of July 2004

A handwritten signature in black ink, consisting of a stylized 'C' and 'M' followed by a long horizontal stroke.

Claire MOUGET-GONIOT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PLANT PROTEIN-BASED MICROCAPSULES

The present invention relates to a method for preparing plant protein-based microcapsules, and to the use of these capsules in the pharmaceutical, veterinary, cosmetics, agrofoods, chemical and biomedical fields.

Microencapsulation includes all technologies for obtaining individualized particles, the size of which is between 1 μm and 1 mm, and which lead to the inclusion of substances or of active principles in a carrier material.

Two groups of microparticles are conventionally distinguished:

- reservoir microcapsules or systems: these are spherical particles consisting of a solid envelope and a core of liquid, solid or pasty active material,
- matrix microspheres or systems: they consist of a continuous network of coating material in which the substance to be encapsulated is dispersed.

Three types of encapsulation methods exist: physico-chemical methods (simple coacervation, complex coacervation, solvent evaporation, solvent extraction-evaporation, hotmelt of the coating material), chemical methods (interfacial polycondensation, polymerization in dispersed medium and gelling of the coating material) and mechanical methods (encapsulation in a fluidized air bed, by spraying and by prilling).

Complex coacervation is based on the phenomenon of desolvation of macromolecules, one positively charged and the other negatively charged, resulting in the formation of two immiscible phases, from initially homogeneous colloidal aqueous solutions. These two phases are:

- the polymer-rich and water-depleted coacervate which results from the formation of complexes between the positively charged macromolecules and those which are negatively charged,
- the polymer-depleted and water-rich supernatant.

The encapsulation of an oil by complex coacervation consists in emulsifying the oil in a solution of two

polymers. The coacervation is induced by adjusting the pH of the medium. The polymeric complexes formed adsorb onto the droplets of oil and thus isolate them from the outside medium. The wall formed is hardened by cooling the medium and crosslinked by the action of a crosslinking agent.

The encapsulation of an active substance offers considerable advantages, such as its protection against outside agents or its slow release, delayed release or deferred release at the site of use.

For applications in the pharmaceutical, veterinary, cosmetics, agrofoods and biomedical fields, the materials most commonly desired as constituents of the wall are natural substances, in particular proteins or polysaccharides, due to their biocompatibility and their biodegradability. Among these biopolymers, albumin, gelatin, collagen and casein have been the subject of many studies.

Thus, capsules of albumin and sodium alginate have been prepared by complex coacervation in order to develop a system for encapsulating proteins and polypeptides (Singh et al., J. Pharm. Pharmacol., (1989) 41, 670-673).

Another study describes the encapsulation of an active principle in casein microspheres prepared by solvent emulsion-extraction, and it has been demonstrated that this milk protein constitutes a potential carrier for sustained-release oral preparations (Latha et al., J. Control. Rel., (1995) 34, 1-7).

For the last few years, a novel approach has consisted in using proteins of plant origin rather than animal origin. In fact, since the discovery of spongiform encephalopathy of animal origin ("mad cow" disease), consumers no longer have any confidence in products which may be contaminated by prions, the agent potentially responsible for this pathology. It is therefore becoming necessary to find a substitute for animal proteins such as gelatin and albumin. Several encapsulation techniques using these polymers of plant origin have been described in the literature.

It has been possible to encapsulate an antibiotic by simple coacervation using wheat gluten and casein as coating materials, with the aim of obtaining a sustained-release system (Jiunn-Yann Yu et al., J. of

Fermentation and Bioengineering, (1997) Vol. 84, 5, 444-448).

5 Another controlled-release system has been developed using nanoparticles of gliadin (protein fraction of wheat gluten) obtained by a method based on desolvation of macromolecules, by addition of a protein organic phase to an aqueous phase (Ezpeleta et al., Int. J. Pharm., (1996), 131, 191-200).

10 Other studies have shown that it is possible to produce nanoparticles and microparticles from vicilin (pea protein) by simple coacervation (Ezpeleta et al., J. Microencapsulation, (1997), Vol. 14, No. 5, 557-565).

15 Finally, it is possible to prepare particles having a wall made of plant proteins using a reaction consisting of interfacial crosslinking between these proteins and a polyfunctional acylating crosslinking agent. This
20 method makes it possible to encapsulate active substances in the solution, suspension or emulsion state, and any plant protein can be used, in particular those which are extracted from wheat, from soybean, from pea, from rapeseed, from sunflower, from barley or
25 from oats (WO 99/03450).

As regards the complex coacervation method, the couples conventionally used are gelatin as polycation and sodium alginate, polyphosphate or gum arabic as
30 polyanion. Studies have shown that gelatin can be substituted with bovine albumin (Singh et al., J. Pharm. Pharmacol., (1989) 41, 670-673).

35 Although the tendency is to use natural products of plant origin as substitutes for animal proteins, it has not been possible to carry out a method of encapsulation by complex coacervation using plant proteins. In fact, plant proteins are not pure; they present great problems of solubility due to the
40 presence of a soluble fraction and an insoluble fraction, and also possess a low emulsifying capacity compared to that of animal proteins, which makes it necessary to use additional surfactants which interfere in the coacervate fixing phase.

45 Now, the inventors, surprisingly, have developed a method which solves all these problems.

50 The inventors have succeeded in divining a novel method which allows the use of these proteins in a complex coacervation technique.

Thus, a subject of the present invention is a method for producing microcapsules containing a material to be encapsulated, characterized in that a mixture of at least one solubilized plant protein and a polyelectrolyte with an opposite charge to said protein is subjected to complex coacervation in an aqueous medium, optionally followed by hardening, in the presence of said material to be encapsulated.

In a preferred embodiment of the invention, the method comprises:

- a) solubilization of at least one plant protein in an aqueous medium at a pH of between 2 and 7, and below the isoelectric pH of said protein,
- b) centrifugation of the solution obtained in a),
- c) mixing of the supernatant obtained in b) with an aqueous solution of a polyelectrolyte with an opposite charge to that of the plant protein,
- d) coacervation of the polyelectrolytes in the form of polymeric complexes, and optionally hardening of the capsules, in the presence of the material to be encapsulated.

The centrifugation step b) is carried out under correctly chosen conditions, in particular at a rate of between 2 000 and 15 000 rpm, preferably between 4 000 and 12 000 rpm, for 10 to 30 minutes.

In a particularly advantageous embodiment of the invention, the method is characterized in that the amount of soluble proteins is increased by:

- e) addition of an amount of plant proteins to the supernatant with the aim of achieving saturation,
- f) centrifugation of the mixture, and
- g) optionally repetition of steps e) and f) several times.

Very advantageously, the method of production according to the invention is characterized in that step c) is carried out at a pH below the isoelectric pH of the plant protein, so that said protein is used as a cationic polyelectrolyte in the complex coacervation step d).

Also advantageously, the method for producing a plant protein-based microcapsule wall is characterized in that step c) is carried out at a pH above the isoelectric pH of the plant protein, so that said protein is used as an anionic polyelectrolyte in the complex coacervation step d).

The protein concentration in the initial solution is generally between 2 and 15%, the concentration of the supernatant of the initial solution of proteins centrifuged is between 1 and 8%, and the concentration of proteins in the coacervation solution is between 1.5 and 5%.

The plant proteins used in the context of the invention are extracted from plants chosen from the group comprising: lupin (genus *Lupinus*), soybean (genus *Glycine*), pea (genus *Pisum*), chickpea (*Cicer*), alfalfa (*Medicago*), broad bean (*Vicia*), lentil (*Lens*), bean (*Phaseolus*), rapeseed (*Brassica*), sunflower (*Helianthus*) and cereals such as wheat, maize, barley, malt or oats. By way of example, mention may be made of the plant proteins SWP100 and SWP50 and those marketed under the name Supro® 670 and PISANE®.

Advantageously, the anionic polyelectrolyte is chosen from those conventionally used by those skilled in the art, in particular those which are chosen from the group comprising sodium alginate, gum arabic, polyphosphates, sodium carboxymethylcellulose, carrageenan, xanthan gum and plant proteins with a pH above the pHi. Advantageously, the cationic polyelectrolyte is one of those conventionally used by those skilled in the art, in particular those which are chosen from the group comprising cationic surfactants, latexes having a quaternary ammonium, chitosan and plant proteins with a pH below the pHi.

When the method comprises a hardening step, this step can be carried out by any technique known to those skilled in the art, in particular by crosslinking with a crosslinking agent chosen from the group comprising dialdehydes such as glutaraldehyde and tannins such as tannic acid.

When the cationic polyelectrolyte is chitosan, the hardening is carried out using acetic anhydride as hardening agent.

In a particularly advantageous embodiment of the invention, use is made of a polycation/polyanion couple chosen from the group comprising the couples:

SWP100/alginate, SWP100/gum arabic, chitosan/Supro®,
5 Supro®/alginate or Supro®/gum arabic.

The microcapsules obtained by the method according to the invention have a diameter of between 5 and 500 μm , preferably 20 and 200 μm , more preferably from 20 to
10 50 μm .

The microcapsules according to the invention may contain substances which can be used in the pharmaceutical, veterinary, cosmetics, agrofoods, chemical and biomedical fields, and in particular
15 active principles. They may be combined with any active ingredient or any excipient well known to those skilled in the art.

20 The examples which follow illustrate the invention without, however, limiting it.

25 **EXAMPLE 1: Complex coacervation using the SWP100 protein in the presence of alginate**

A 10% SWP100 solution maintained at pH 3 is centrifuged for 25 minutes at 4 500 rpm. 48 ml of supernatant containing 0.72 g of dissolved proteins are obtained.
30 20 g of Miglyol® 812 are emulsified in this supernatant solution. 35.6 ml of an aqueous solution of sodium alginate (0.36 g) are then added followed by 96 ml of water. The temperature of the medium is 40°C. The pH of the medium is decreased from 4.22 to 3 by adding 1N
35 hydrochloric acid.

The SWP100/alginate ratio by weight is equal to 2 and the final concentration, in the aqueous phase, of SWP100 is 0.4% weight/volume and it is 0.2%
40 weight/volume for the alginate.

The complex coacervation takes place and the medium is cooled to 10°C and kept at 10°C for 1 hour. 1.5 ml of 25% glutaraldehyde are added to the medium at 10°C. The
45 medium is then allowed to return to ambient temperature and it is kept stirring for 15 hours.

A dispersion of microcapsules containing 95% oil, with a mean size of between 200 and 400 μm , is obtained.
50

Microcapsules for which the SWP100/alginate ratio by weight is equal to 1 are prepared by the same technique.

5 **EXAMPLE 2: Complex coacervation using the SWP100 protein in the presence of gum arabic**

10 A solution of 100 ml of SWP100 at 17% maintained at pH 3 is centrifuged for 25 minutes at 4 500 rpm. 100 ml of supernatant containing 2.6 g of dissolved proteins are obtained. 20 g of Miglyol® 812 are emulsified in this supernatant solution. 45 ml of an aqueous solution of gum arabic (5 g) and 13 ml of water are added. The temperature of the medium is 40°C. The pH of the medium
15 is decreased to 3 by adding 1N hydrochloric acid.

The SWP100/gum arabic ratio by weight is equal to 1/2 and the final concentration of SWP100 in the aqueous phase is 1.5% weight/volume and it is 3% weight/volume
20 for the gum arabic.

The complex coacervation takes place and the medium is cooled to 10°C. The medium is left stirring for 1 hour and 3 ml of 25% glutaraldehyde are then added. The
25 medium is then allowed to return to ambient temperature, still with stirring for 6 hours.

A dispersion of microcapsules containing 72.5% oil, with a mean size of between 150 and 450 µm, is obtained.
30

35 **EXAMPLE 3: Influence of increasing the concentration of SWP100 protein in the supernatant**
Complex coacervation using the SWP100 protein in the presence of alginate

The pH of a protein solution of SWP100 at approximately 15% (20 g in 130 g of water) is adjusted to a value of 4. The solution is centrifuged a first time at
40 12 000 rpm for 15 minutes. The pellet is removed and 12 g of SWP100 protein is added to the supernatant, the pH of which is again adjusted to 4.

A second centrifugation is performed and this operation
45 is repeated a third time.

After the first centrifugation, the supernatant contains 2.9% of soluble protein. After three centrifugations, the soluble protein concentration is
50 3.6%.

The SWP100/gum arabic ratio by mass is equal to 1 and the final concentration of SWP100 and of gum arabic in the aqueous phase is 2% weight/volume.

5 The complex coacervation is carried out with the concentrated supernatant of SWP100 at pH 4 (100 ml containing 3.6 g of protein) and the gum arabic as anionic polyelectrolyte (80 ml containing 3.6 g of gum arabic). The coacervation is carried out according to
10 the procedure described in Example 1.

A dispersion of microcapsules containing 73.5% oil, with a mean size of between 50 and 400 μm , is obtained.

15

EXAMPLE 4: Complex coacervation using the Supro® 670/alginate couple

Capsules are prepared according to the procedure of
20 Example 1, using a solution of Supro® 670 made up of 22.5 g of water and 2.5 g of protein and a solution of alginate made up of 150 g of water and 1.84 g of alginate.

25 The coacervation pH is equal to 3.8.

Microcapsules in suspension, which contain 82% oil and which exhibit a fragile wall with a granular appearance, are obtained. The mean size of the microcapsules is
30 between 50 and 400 μm .

EXAMPLE 5: Evaluation of the plant proteins as anionic polyelectrolyte

35

A solution of Supro® 670 protein at 10% is adjusted to pH 7 and centrifuged a first time at 4 500 rpm for 25 minutes. The pellet is removed and the supernatant made up of 43 ml of water and 2.57 g of protein is used for
40 the coacervation.

20 g of Miglyol® 812 are emulsified in the supernatant of the Supro® 670 protein solution, and then a solution of chitosan 2622 made of 120 ml of water and 1.5 g of
45 chitosan, at pH 1.32, is added to the medium at 40°C.

The coacervation pH is adjusted to 6. The procedure is then identical to that described for example 1.

50 A dispersion of microcapsules containing 83% oil, with a mean size of between 50 and 400 μm , is obtained.

CLAIMS

1. A method for producing microcapsules containing a material to be encapsulated, characterized in that a mixture of at least one solubilized plant protein and a polyelectrolyte with an opposite charge to said protein is subjected to complex coacervation in an aqueous medium, optionally followed by hardening, in the presence of said material to be encapsulated.
2. The method for producing plant protein-based microcapsules as claimed in claim 1, characterized in that it comprises:
- a) solubilization of at least one plant protein in an aqueous medium at a pH of between 2 and 7, and below the isoelectric pH of said protein,
 - b) centrifugation of the solution obtained in a),
 - c) mixing of the supernatant obtained in b) with an aqueous solution of a polyelectrolyte with an opposite charge to that of the plant protein,
 - d) coacervation of the polyelectrolytes in the form of a polymeric complex, and optionally hardening of the capsules, in the presence of the material to be encapsulated.
3. The method for producing plant protein-based microcapsules as claimed in claim 2, characterized in that the amount of soluble proteins is increased by:
- e) addition of an amount of plant proteins to the supernatant obtained in step b),
 - f) centrifugation of the mixture, and
 - g) optionally repetition of steps e) and f) several times.
4. The method for producing plant protein-based microcapsules as claimed in any one of claims 1 to 3, characterized in that step c) is carried out at a pH below the isoelectric pH of the plant protein, so that said protein is used as a cationic polyelectrolyte in the complex coacervation step d).
5. The method for producing plant protein-based microcapsules as claimed in any one of claims 1 to 3,

characterized in that step c) is carried out at a pH above the isoelectric pH of the plant protein, so that said protein is used as an anionic polyelectrolyte in the complex coacervation step d).

- 5
6. The method as claimed in any one of claims 1 to 5, characterized in that the plant proteins are extracted from plants chosen from the group comprising: lupin (genus *Lupinus*), soybean (genus *Glycine*), pea (genus
- 10 *Pisum*), chickpea (*Cicer*), alfalfa (*Medicago*), broad bean (*Vicia*), lentil (*Lens*), bean (*Phaseolus*), rapeseed (*Brassica*), sunflower (*Helianthus*) and cereals such as wheat, maize, barley, malt or oats.
- 15 7. The method as claimed in any one of claims 1 to 4 and 6, characterized in that the anionic polyelectrolyte is chosen from the group comprising sodium alginate, gum arabic, polyphosphates, sodium carboxymethylcellulose, carrageenan, xanthan gum and
- 20 plant proteins with a pH above the pHi.
8. The method as claimed in any one of claims 1 to 3 and 5 to 6, characterized in that the cationic polyelectrolyte is chosen from the group comprising
- 25 cationic surfactants, latexes having a quaternary ammonium, chitosan and plant proteins with a pH below the pHi.
9. The method as claimed in any one of claims 1 to 7,
- 30 characterized in that the hardening is carried out by crosslinking with a crosslinking agent chosen from the group comprising dialdehydes such as glutaraldehyde and tannins such as tannic acid.
- 35 10. The method as claimed in claim 8, characterized in that, when the cationic polyelectrolyte is chitosan, the hardening is carried out using acetic anhydride as hardening agent.
- 40 11. The method as claimed in any one of claims 1 to 10, characterized in that use is made of a polycation/polyanion couple chosen from the group comprising the couples: SWP100/alginate, SWP100/gum arabic, chitosan/Supro®, Supro®/alginate or Supro®/gum
- 45 arabic.
12. The use of the capsules obtained by the method as claimed in any one of claims 1 to 10, for producing compositions which are useful in the pharmaceutical,
- 50 veterinary, cosmetics, agrofoods, chemical and biomedical fields.

13. A pharmaceutical, veterinary, cosmetic, agrofoods or chemical composition, characterized in that it contains microcapsules as claimed in any one of claims 1 to 11, in combination with any acceptable excipient.

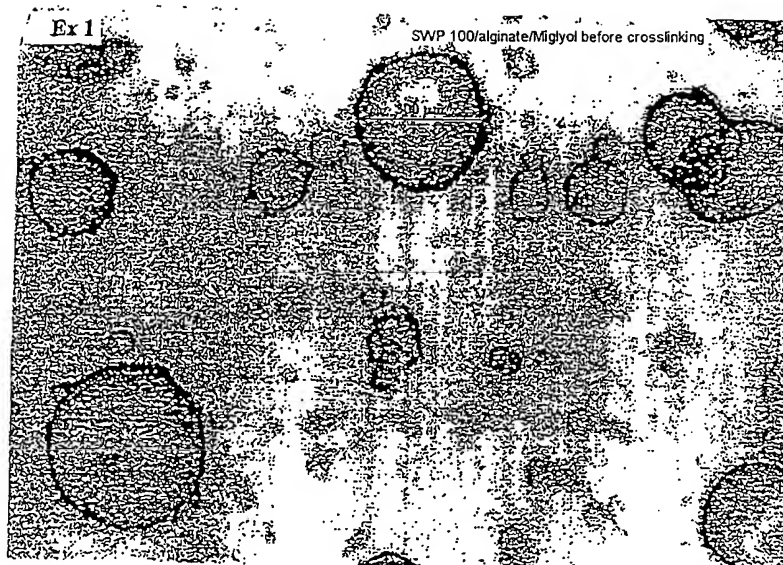


Figure 1

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 02/01652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	B01J13/10	B01J13/20 A61K7/00 A61K9/50 A23P1/04
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 B01J A61K A23P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)		
WPI Data, EPO-Internal, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6 197 757 B1 (ANDRY MARIE-CHRISTINE ET AL) 6 March 2001 (2001-03-06) column 5, line 50 -column 11, line 44; claims 17-19,27-32,45-56 -----	1-13
A	WO 99 38945 A (GUERIN GILLES ; JOUBERT DANIEL (FR); MORVAN MIKEL (FR); RHONE POULE) 5 August 1999 (1999-08-05) the whole document -----	1-13
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the International filing date 'L' document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 September 2002		24/09/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Willsher, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 02/01652

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6197757	B1	06-03-2001	FR 2780901 A1	14-01-2000
			DE 19932216 A1	27-01-2000
			ES 2155793 A1	16-05-2001
			IT T0990599 A1	10-01-2000
			JP 2000038402 A	08-02-2000
			KR 2000011579 A	25-02-2000
			NL 1012517 C2	11-01-2000
WO 9938945	A	05-08-1999	FR 2774389 A1	06-08-1999
			AU 2062199 A	16-08-1999
			CA 2318383 A1	05-08-1999
			EP 1051472 A1	15-11-2000
			WO 9938945 A1	05-08-1999
			JP 2002501976 T	22-01-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

: Internationale No

PCT/FR 02/01652

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 B01J13/10 B01J13/20 A61K7/00 A61K9/50 A23P1/04		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 B01J A61K A23P		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) WPI Data, EPO-Internal, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 6 197 757 B1 (ANDRY MARIE-CHRISTINE ET AL) 6 mars 2001 (2001-03-06) colonne 5, ligne 50 -colonne 11, ligne 44; revendications 17-19,27-32,45-56	1-13
A	WO 99 38945 A (GUERIN GILLES ; JOUBERT DANIEL (FR); MORVAN MIKEL (FR); RHONE POULE) 5 août 1999 (1999-08-05) le document en entier	1-13
<input type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée 17 septembre 2002		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale 24/09/2002
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale: Office Européen des Brevets, P.B. 5018 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Willsher, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

nde Internationale No
PCT/FR 02/01652

Document breveté au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6197757	B1	06-03-2001	FR 2780901 A1	14-01-2000
			DE 19932216 A1	27-01-2000
			ES 2155793 A1	16-05-2001
			IT T0990599 A1	10-01-2000
			JP 2000038402 A	08-02-2000
			KR 2000011579 A	25-02-2000
			NL 1012517 C2	11-01-2000
WO 9938945	A	05-08-1999	FR 2774389 A1	06-08-1999
			AU 2062199 A	16-08-1999
			CA 2318383 A1	05-08-1999
			EP 1051472 A1	15-11-2000
			WO 9938945 A1	05-08-1999
			JP 2002501976 T	22-01-2002